

采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性

钱 韦 葛 颂* 洪德元

(中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室, 北京 100093)

摘要: 用随机扩增多态 DNA (RAPD) 和 inter-简单重复序列 (ISSR) 标记对分别来自中国海南和云南 20 个居群的疣粒野生稻 (*Oryza granulata* (Nees et Arn. ex Watt.) 混合样品, 以及海南 (M5) 和云南 (M27) 2 个居群各 20 个植株的遗传多样性进行了检测。在混合取样的居群中, 20 个 RAPD 引物和 12 个 ISSR 引物分别扩增出 209 和 122 条带, 多态条带比率 (PPB) 分别为 64.11% 和 72.95%。对于分单株取样的居群, 在 M5 中, 两种标记分别扩增出 146 和 95 条带, PPB 值分别为 21.48% 和 34.78%。在居群 M27 中, 则分别扩增出 151 (PPB = 17.22%) 和 94 (PPB = 19.15%) 条带。结果表明, 中国的疣粒野生稻在物种水平的遗传多样性较低, 其遗传变异主要存在于海南和云南两地之间, 而在居群内的遗传多样性水平很低。基于 Jaccard 遗传相似性系数的 UPGMA 聚类 and 基于多态条带表型的主成分分析 (PCA) 都将中国的疣粒野生稻分为来自海南和云南两类, 两地间该物种的平均遗传相似性分别为 0.596 (RAPD) 和 0.511 (ISSR), 其间产生了相当程度的遗传分化。对比 RAPD 和 ISSR 在 PCR 反应中的稳定性和检测变异的能力表明, 对于实验条件的稳定性而言 ISSR 优于 RAPD, 且总的来说 ISSR 能检测到比 RAPD 更多的遗传变异。Mantel 检测表明, 在物种水平, 这两种标记的分析结果有极显著的相关性 ($r = 0.917, t = 12.789$); 而在居群水平, 则分析结果极不一致 ($r < 0.200$)。这与它们所扩增的相应基因组片段的变异方式有关。同时, 也反映了疣粒野生稻居群内和居群间存在不同的进化模式。根据以上结论, 在进行中国的疣粒野生稻原位保护选址和迁地保护的取样过程中, 应更注意不同地区与居群的代表性。

关键词: 疣粒野生稻; RAPD; ISSR; 遗传多样性; 保护生物学

中图分类号: Q941 文献标识码: A 文章编号: 0577-7496(2000)07-0741-10

Assessment of Genetic Variation of *Oryza granulata* Detected by RAPDs and ISSRs

QIAN Wei, GE Song*, HONG De-Yuan

(Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) methods were applied to detect genetic variation of 20 bulking samples and two individually sampled populations of *Oryza granulata* (Nees et Arn. ex Watt.) from China (M5 from Hainan Province and M27 from Yunnan Province). For the bulking sampled populations, 20 RAPD and 12 ISSR primers generated 209 and 122 bands, of which 134 (64.11%) and 89 (72.95%) were polymorphic respectively. For population M5, 146 and 95 bands were generated with 21.48% and 34.78% being polymorphic (PPB). For population M27, 151 (PPB = 17.22%) and 94 (PPB = 19.15%) bands of RAPD and ISSR were obtained. The results indicated that the level of genetic variation of *O. granulata* was lower than other species detected in the genus *Oryza*. UPGMA cluster based on genetic similarity and principle component analyses (PCA) based on band patterns divided the populations into two groups corresponding to their sources, which revealed that the majority of genetic variation of *O. granulata* occurred between Hainan and Yunnan. Consequently, more populations of the species should be considered for a reasonable conservation management. Comparison between the two marker systems showed that ISSR was better than RAPD in terms of reproducibility and ability of detecting genetic polymorphism. Mantel test revealed that the goodness of fit between them was significant ($r = 0.917, t = 12.718$) when detecting genetic diversity at species level, but was poor at population level ($r < 0.200$). The

discrepancy was considered as the facts that different fragments were targeted by RAPD and ISSR, and that evolutionary process of *O. granulata* varied at different hierarchical levels.

Key words: *Oryza granulata*; RAPD; ISSR; genetic diversity; conservation biology

物种的进化就是其居群内基因频率在各种进化动力作用下,随时间推移而在数量和空间分布格局上发生动态演化的过程^[1,2]。因此,鉴定植物个体的基因型并确定居群内的基因频率是植物居群遗传学和保护遗传学研究的首要问题。理想的遗传标记应具有对基因组取样无偏离、共显性、对变异的检测分辨率高以及不受环境条件直接影响等特点^[3]。此外,任何基于居群理论的研究对实验材料都有一定数量的样本要求,故标记体系的实验稳定性和易用性也是评价其优劣的重要标准^[4,5]。

在众多生化和 DNA 分子标记中,随机扩增多态性 DNA (RAPD)^[6]和 inter-简单序列重复 (ISSR)^[7]在植物遗传多样性研究中获得了成功^[4,8,9]。其中,ISSR 是一种类似 RAPD,但利用包含重复序列并在 3' 或 5' 锚定的单寡聚核苷酸引物对基因组进行 PCR 扩增的标记系统。相对于组织蛋白和等位酶分析而言,RAPD 和 ISSR 具有多态性高、无需活材料、能实现全基因组无偏取样和无组织器官特异性等优点;与微卫星分析 (microsatellite 或 SSR) 相比,二者不要求预知基因组序列信息,大大减少了多态性分析的预备工作;对比扩增片段长度多态 (AFLPTM) 则在模板 DNA 的用量、实验繁琐程度和费用上占有优势^[10]。当然,由于它们都是显性遗传标记,不能区分显性纯合基因型和杂合基因型,妨碍了 RAPD 与 ISSR 在居群遗传学中的深入应用^[10,11]。但是,对于父系分析、估计异交率和克隆植物多样性这类基于基因型鉴定的居群遗传学和分子生态学研究领域,标记体系的显性遗传方式并无太大的影响^[10,12]。而且在等位酶分析不能获得多态位点的情况下和绝大多数缺乏分子遗传学研究背景的濒危植物遗传多样性水平评价中,RAPD 和 ISSR 将发挥极为重要的作用^[3,5,8,10]。

疣粒野生稻是分布在我国三种野生稻之一,生长于云南省的热带地区和海南省西南部。在稻属 20 余种植物中,它被确定属于 GG 基因组^[13],在稻属系统树中位于最基部^[14]。由于很难与栽培稻进行杂交,加上仅分布在中国和东南亚地区,相对于本属其他植物,疣粒野生稻是迄今最为缺乏了解的稻属植物。但是,作为具有耐荫、抗旱和对白叶枯病免疫等特性^[15]的重要种质资源,疣粒野生稻在生物工

程技术飞速发展的今天有着广阔的应用前景。然而,根据我们 1997~1999 年两次对分布于海南和云南两省 22 个县(市),33 个分布点超过 50 个居群的野外调查,发现有 12.9% 的居群已经灭绝,83.9% 的居群处于严重的人为干扰中,因此从物种保护的角度的上对其遗传多样性和遗传结构进行研究具有重要意义。此外,疣粒野生稻具有居群内遗传多态性极低,但居群间遗传多态性极高的特点^[16],可以用来探讨各种遗传标记的效率和分辨力。

本文利用 2 种 DNA 分子标记技术对分布于中国的疣粒野生稻居群内和居群间遗传多样性进行了检测,目的在于(1)对比 RAPD 和 ISSR 在检测疣粒野生稻样品遗传多样性时的效率和分辨力,评价它们在应用于植物居群遗传学和保护遗传学研究中的前景;(2)在研究疣粒野生稻 DNA 水平的遗传多样性的基础上,讨论中国疣粒野生稻保护中应注意的问题。

1 材料和方法

1.1 植物材料

实验材料疣粒野生稻(*Oryza granulata* (Nees et Arn. ex Watt.))的采集均利用居群取样的方法进行。根据居群大小,从每个居群各取 16~100 株个体的新鲜叶片,分别用变色硅胶进行快速干燥固定,带回实验室于室温下保存。从上述材料中选取具有充分代表性的 20 个居群(表 1)将每个居群 10~14 株个体的叶片等量混合(pooling)后,提取总 DNA。为探讨 RAPD 和 ISSR 检测居群内遗传多样性的能力,以及叶片等量混合后的检测结果是否能反映各单株样品内的遗传变异,选取了个体数量较多的海南省乐东县冲坡居群(M5)和云南省思茅市竹林居群(M27)各 20 个个体分单株提取总 DNA。

1.2 方法

1.2.1 疣粒野生稻总 DNA 提取 按照谢中稳等^[17]的方法进行总 DNA 的提取,并根据疣粒野生稻的特点略作改动。用于正式实验的样品总 DNA 均用 RNA 酶 A 进行纯化。

1.2.2 RAPD 产物及检测 利用 4 份来自海南和云南的材料进行预备实验,从 79 个 RAPD 引物(Operon 公司)中选取 20 个能获得清晰条带,反应

表 1 中国疣粒野生稻遗传多样性研究取样地点

Table 1 List of *Oryza granulata* populations included in the study

Code of samples	Population	Distributed site of accessions
1	M1	Zhayun, Qiongzong County, Hainan
2	M2	Maoyang, Tongshi City, Hainan
3	M3	Juntian, Lingshui County, Hainan
4	M4	Licai, Sanya City, Hainan
5	M5	Chongpo, Ledong County, Hainan
6	M12	Qichai, Changjiang County, Hainan
7	M13	Jianfeng, Ledong County, Hainan
8	M14	Jinbo Baisha County, Hainan
9	M15	Fengwei, Zhenkang County, Yunnan
10	M16	Nanla, Cangyuan County, Yunnan
11	M18	Huohai, Gengma County, Yunnan
12	M20	Qianxin, Shuanjiang County, Yunnan
13	M21	Mengnuo, Longling County, Yunnan
14	M22	Naban, Yingjiang County, Yunnan
15	M23	Pingyuan, Yingjiang County, Yunnan
16	M24	Gasha, Jinghong City, Yunnan
17	M25	Menghan, Jinghong City, Yunnan
18	M27	Manyao, Simao City, Yunnan
19	LC1	Reshuitan, Lancang County, Yunnan
20	M30	Mandang, Yuanjiang County, Yunnan

稳定的引物 (B-6、B-7、B-12、K-3、K-6、K-8、K-9、K-11、K-12、K-13、K-15、Y-1、Y-2、Y-9、Y-14、Y-15、Y-18、Y-19、Z-3 和 Z-4) 进行下一步分析。每个 RAPD PCR 反应为 10 μ L/管, 其中包括 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 500 μ g/mL BSA, 10% Ficoll, 1 mmol/L Tartrazine, 2 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol dNTP, 1 μ mol 引物, 5 ng DNA 模板和 0.5 U *Taq* 酶。反应在 1818 型毛细管型快速热循环仪 (Idaho Tech.) 上进行。首先 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 35 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 2 个循环, 然后进行以下 40 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 0 s, 35 $^{\circ}$ C 0 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min。最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。反应产物在含有 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳检测。紫外灯下观察拍照, 用 100 bp 的 DNA ladder 作为分子量标记。

1.2.3 ISSR 产物及检测 按照与 RAPD 相同的筛选策略从 30 个 ISSR 引物中选出 13 个用于 ISSR PCR 反应 (表 2)。反应体积和组分与 RAPD 相似 (Mg²⁺ 浓度从 1.5 ~ 2.5 mmol/L, 按不同引物), 另加入 4% 的 DMSO 以提高反应的特异性。反应首先 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 然后进行以下 38 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 2 s, 50 $^{\circ}$ C 2 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。反应产物在含有 EB 的 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳检测。记录和拍照同 RAPD。

1.2.4 数据分析 RAPD 与 ISSR 都是显性标记, 同

表 2 ISSR 引物序号与序列

Table 2 List of ISSR primers and their sequences used in the study

Primer	Sequence (5'-3')
ISSR-4	BDB(CA) ₈
ISSR-5	VHV(GT) ₇
ISSR-6	DBD(GA) ₇
ISSR-7	G(C) ₄
ISSR-8	(CT) ₈ RG
ISSR-9	(CT) ₈ RC
ISSR-15	CC(C) ₈ GT
ISSR-16	GSC(GT) ₈
ISSR-17	CS(C) ₈ GA
ISSR-18	GCWC(AG) ₈
ISSR-20	CCA(GTG) ₄
ISSR-21	GC(C) ₈ AC

B = C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, H = A/C/T, S = G/C, W = A/T, N = A/G/C/T.

一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性, 属于同一位点的产物并按扩增阳性 (1) 和扩增阴性 (0) 记录电泳带谱, 形成 RAPD 和 ISSR 表型数据矩阵用于进一步分析。为反映 RAPD 和 ISSR 标记的多态性, 统计各引物的多态条带比率 (PPB), 并利用 POPGENE 软件计算 RAPD 和 ISSR 扩增产物的 Shannon 多样性指数 $H' = -\sum p_i \ln p_i$, 其中 p_i 为产物条带的表型。在此基础上, 利用以下两种方法研究各样品之间的遗传关系: 首先用 RAPDistance 程序计算样品之间的 Jaccard 相似性系数作为遗传距离 (Nei 遗传距离及其无偏估计不能直接应用于显性标记的数据), 并用 NTSYS^[18] 中的 SHAN 程序进行 UPGMA 聚类分析样品间的遗传关系; 其次, 选择 RAPD 和 ISSR 的多态条带, 用主成分分析 (PCA) 研究各居群的表型数据矩阵, 并以此研究各样品间的遗传关系。最后, 用 Mantel 检测计算同一居群 RAPD 和 ISSR 相似性系数之间的相关性, 用以分析这两种标记方法得出的结果间的一致程度。

2 实验结果

2.1 反应稳定性

为了对比 RAPD 和 ISSR 对 PCR 反应条件的敏感性, 通过改变 PCR 反应组分中的 DNA 模板浓度、模板降解程度、模板纯度和 Mg²⁺ 浓度, 对两种标记扩增的稳定性与对照结果进行了对比。首先, 参与分析的所有 RAPD 和 ISSR 引物都对 DNA 模板浓度的变化不甚敏感, 当模板浓度从每反应 2.5 ng 到每反应 100 ng 改变时, RAPD (图 1A) 和 ISSR 条带的谱带没有大的变化。其次, 实验证明对于 DNA 不均匀降解的野外固定材料, RAPD 和 ISSR 仍可获得可信的结果, 但是对于材料固定、DNA 提取和保存过

程中降解严重的样品,则会出现扩增失败的情况。模板纯度对 RAPD 和 ISSR PCR 反应的影响不一致:对于未经纯化、经 RNA 酶 A 纯化和经 RNA 酶 A-蛋白酶 K 纯化的三种模板,所有 ISSR 引物均能获得一致的带谱。而对于 RAPD 来说,不同引物对模板纯度的扩增稳定性不一样:所有 RAPD 引物都对经 RNA 酶 A 纯化后的模板不敏感,但是对于经蛋白酶 K 纯化过后的模板,大部分引物如 B-6、K-9、K-11、K-12、Y-18、Z-3 等都出现带谱的明显变化。以 Y-18 为例,对比对照实验主要表现为低分子量产物减少和丰度降低(图 1B)。少部分引物,包括 B-7、B-12、Y-3、Y-15 和 Y-19 在蛋白酶 K 处理模板和对照中能保持较高的稳定性。因此,RAPD 对模板纯度的不稳定性与特定引物和特定样品材料有关。据此,在正式的分析中只对样品 DNA 进行了 RNA 酶 A 处理并严格保证所有样品 DNA 提取和纯化步骤的一致性。

ISSR 引物对 Mg^{2+} 浓度的敏感程度大于 RAPD。

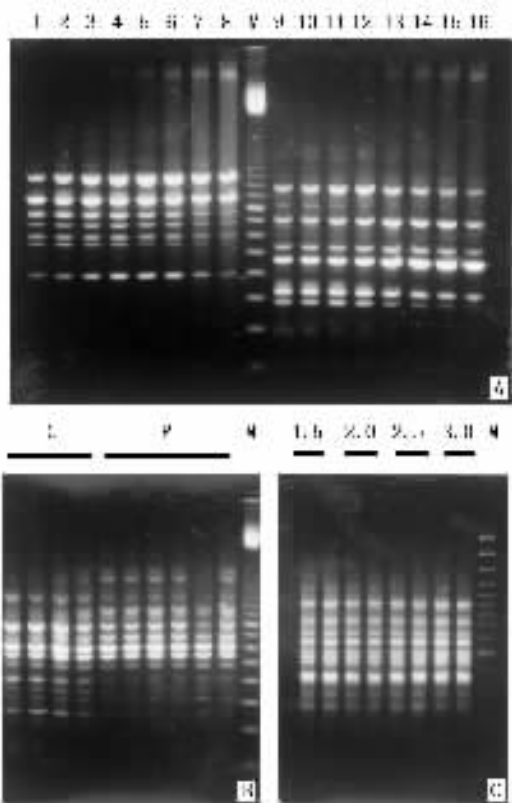


图 1. 中国疣粒野生稻的 RAPD 和 ISSR 的实验稳定性。

Fig. 1. Reproducibility of RAPD and ISSR amplification generated from *Oryza granulata* genomic DNA.

A, influence of different concentration of DNA template from 2.5, 5.0, 10, 20, 40, 60, 80 to 100 ng on RAPD products by using primer OPK8 (1–8) and OPB12 (9–16); B, comparison of RAPD products of Y-18 between proteinase K-treated template (P) and control (C); C, influence of different concentration of Mg^{2+} from 1.5 mmol/L to 3.0 mmol/L on ISSR products by using ISSR-5. M, 100 bp ladder.

例如 ISSR-5 在 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 时非特异性产物减少,能获得比在 2.0 mmol/L 和 3.0 mmol/L 清晰的带谱。升高 Mg^{2+} 浓度导致产物丰度和非特异性产物的增加(图 1C)。在随后的正式分析中,所有 RAPD 反应均在 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 下进行,而 ISSR 分析则根据预备实验对不同引物采取不同的 Mg^{2+} 浓度。除此而外,ISSR 在各方面均表现出比 RAPD 高的稳定性。

2.2 遗传多样性

为对比样品混合与不混合的扩增结果,分别利用 4 个 RAPD 引物(B12、K11、K12 和 Z3)和 4 个 ISSR 引物(ISSR5、7、21 和 22)对混合样品及其中各单株的样品进行了扩增。结果表明,混合样品的 RAPD 和 ISSR 带谱中包含了个体样品扩增中的所有单态条带和绝大部分多态条带,仅有少数多态条带在混合样品中出现扩增阴性。例如 RAPD 引物 B-12,少数个体样品中的 680 bp 条带在混合样品带谱中为阴性(图 2)。因此,在略为低估遗传变异的情况下,混合样品可以作为个体样品的代表,对整个居群的遗传多样性进行评价。同时该方法可以节省大量的实验工作量,有利于对材料进行快速的遗传多样性评价。

两种标记的扩增结果见表 3。在中国疣粒野生稻的 20 个居群中,20 个 RAPD 引物共扩增出 209 条重复性高,清晰的条带,分子量从 220 bp 到 2 200 bp,平均每个引物可扩增出 10.45 条带,其中有 134 条为多态,多态条带比率(PPB)为 64.11%,平均每个 RAPD 引物可获得 6.70 个多态条带。12 个 ISSR 引物共扩增出 122 条带,分子量从 280 bp 到 2 000 bp。平均每个引物扩增出 10.17 条带,其中 89 条为

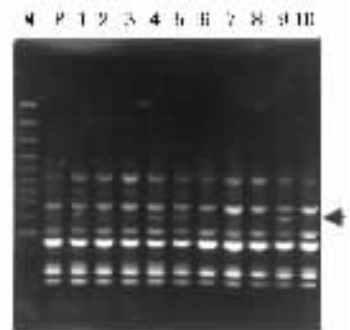


图 2. 混合样品和其中各个体样品 RAPD PCR 扩增带谱的对比。

Fig. 2. Comparison of PCR products between the bulking sample (P) and its component individuals (1–10) by using RAPD primer B-12.

The arrow indicates PCR bands negative in bulking sample but positive in individuals 4, 5, and 9. M, 100 bp ladder.

多态条带 ,PPB 值达 72.95% ,平均每个 ISSR 引物获得 7.41 个多态条带 ,略高于 RAPD 分析获得的结果。利用 Shannon 多样性指数对样品遗传多样性进行评价的结果表明 ,RAPD 引物条带的平均多样性指数为 0.336 ,低于 ISSR 的指数 0.391(表 3)。

地区内疣粒野生稻的遗传多样性偏低(表 3)。在来自云南 12 个居群的样品中 ,RAPD 和 ISSR 分别扩增出 162 和 98 条带 ,其中各有 56(34.57%)和 43(43.88%)条带为多态。在来自于海南 8 个居群的样品中 ,两种标记系统分别获得 182 和 92 条带 ,其中各有 81(44.51%)和 24(26.09%)条为多态条带。

疣粒野生稻居群内的遗传多样性很低(表 3): 20 个 RAPD 引物在居群 M5 和 M27 中各扩增出 146 和 151 条带 ,平均每个引物获得 7.49 和 7.55 条。在所有条带中 ,分别有 32 条和 26 条为多态条带 ,PPB 值分别为 21.48% 和 17.22%。与此类似 ,12 个 ISSR 引物在居群 M5 和 M27 中各扩增出 95 和 94 条带 ,平均每个引物获得 7.91 和 7.83 条 ,PPB 值为 34.78% 和 19.15%。对于居群 M5 和 M27 ,RAPD 分析的 Shannon 多样性指数分别为 0.125 和 0.098。ISSR 的多样性指数分别为 0.183 和 0.111 ,高于相应 RAPD 的分析结果。

2.3 样品间的遗传关系

表 4 总结了基于 Jaccard 系数的遗传相似性系数 (genetic similarity ,GS) 的结果。对于中国疣粒野

生稻的 20 个居群样品 ,遗传相似性偏低 ;基于 RAPD 分析的 GS 值在 0.558 到 0.954 之间 ,平均为 0.727 ;而基于 ISSR 分析的 GS 值在 0.441 到 0.962 之间 ,平均为 0.674。另一方面 ,居群内个体之间的遗传相似性较高 ;对于居群 M5 ,基于 RAPD 和 ISSR 分析的 GS 值分别在 0.905 ~ 0.993 和 0.815 ~ 0.989 之间。ISSR 的平均 GS 值为 0.912 ,低于 RAPD 获得的平均 GS 值 0.954。相对而言 ,ISSR 比 RAPD 可检测到更高的个体间遗传差异。居群 M27 也获得了与居群 M5 类似的结果(表 4)。

基于遗传相似性系数 ,利用 UPGMA 聚类对上述三组样品内部各样品之间的遗传关系进行了分析 ,结果见图 3。对于中国的疣粒野生稻居群 ,RAPD 和 ISSR 获得了相似但不完全相同的聚类树 ,20 个样品按来源被分为两类(海南和云南) ,显示两地的疣粒野生稻之间存在相当程度的遗传分化。对于居群 M5 和 M27 ,基于 RAPD 和 ISSR 数据的 UPGMA 聚类可将所有的个体都区分开 ,个体之间的遗传相似性都比较高。

基于各组样品多态条带表型的主成分分析 (PCA) 支持上述 UPGMA 聚类的结果 ,图 4 显示利用每组分析中提取的前三个主成分得出的 3-D 分布图 ;由图可见 ,来自云南的 12 个居群和来自海南的 8 个居群按来源被分为两组(图 4 ,A、B) ;同一居群

表 3 RAPD 与 ISSR 标记的遗传多态性

Table 3 Analysis of the RAPD and ISSR-generated banding patterns

	No of RAPD bands	No. of RAPD polymorphic bands	PPB ¹⁾ of RAPD	I ²⁾	No. of ISSR bands	No. of ISSR polymorphic bands	PPB of ISSR	I
Among populations								
China ³⁾	209	134	64.11	0.336	122	89	72.95	0.391
Yunnan	162	56	34.57	0.158	98	43	43.88	0.229
Hainan	182	81	44.51	0.213	92	24	26.09	0.115
Within populations								
Population M5	146	32	21.48	0.125	95	32	34.78	0.183
Population M27	151	26	17.22	0.098	94	18	19.15	0.111

1) Percentage of polymorphic bands ; 2) Shannon diversity ; 3) Consists of 20 samples bulked from 20 populations , respectively .

表 4 中国疣粒野生稻 RAPD 和 ISSR 分析遗传相似性

Table 4 Brief summary of genetic similarities within and among populations of *Oryza granulata* based on RAPD and ISSR markers

	Populations of China ¹⁾			Population M5 (Hainan)			Population M27 (Yunnan)		
	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean
RAPD	0.558	0.954	0.727	0.905	0.993	0.954	0.912	0.989	0.950
ISSR	0.441	0.962	0.674	0.815	0.989	0.912	0.890	0.989	0.949
S. D. ²⁾	3.800	5.566		0.068	0.331		0.044	0.129	

1) Consists of 20 samples bulked from 20 populations , respectively ; 2) Squared deviations .

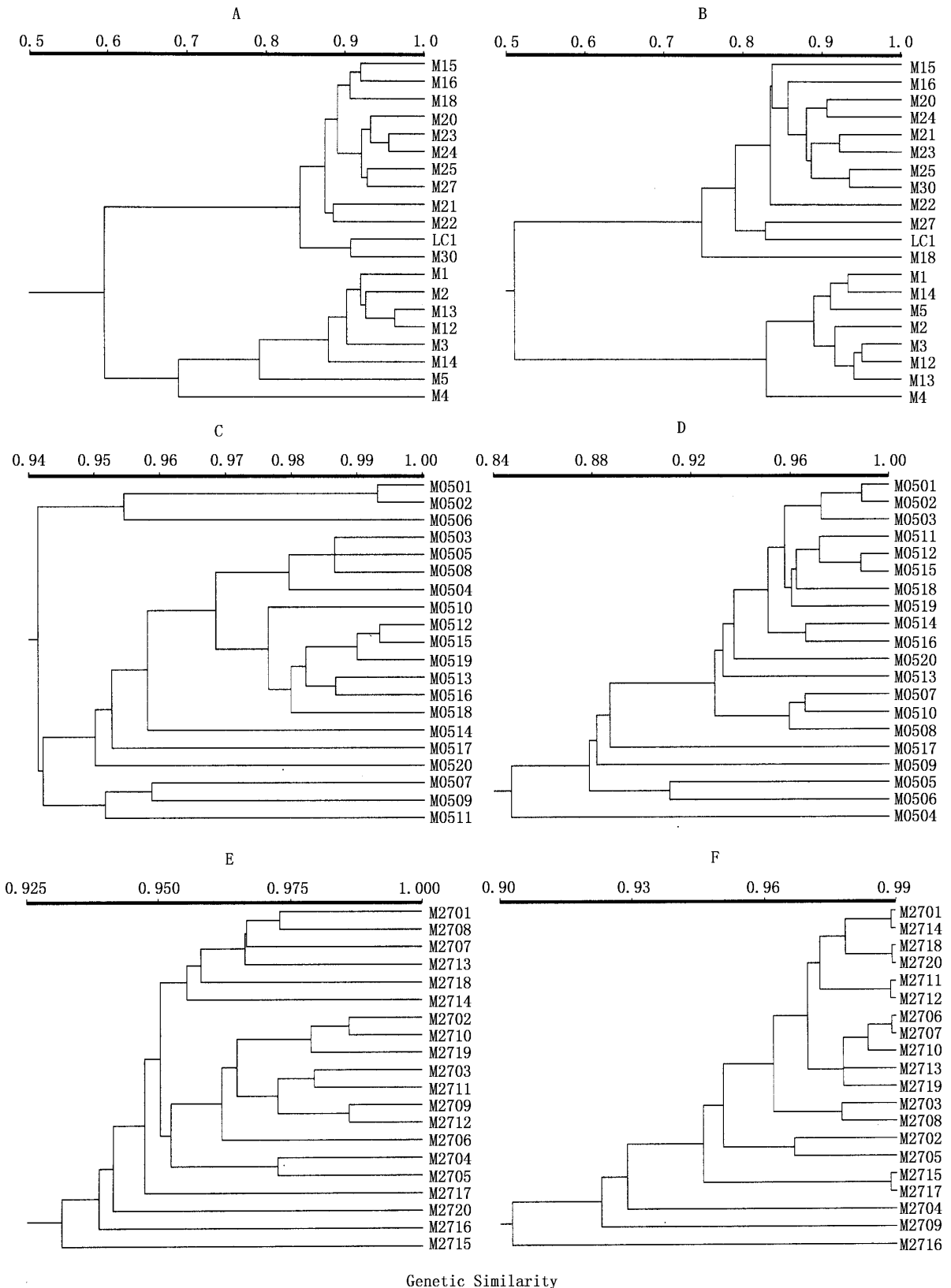


图 3. 中国疣粒野生稻居群内和居群间样品基于 RAPD 和 ISSR 遗传相似性系数 (Jaccard 系数) 的 UPGMA 聚类分析。

Fig. 3. Dendrograms illustrating genetic relationships among and within populations of *Oryza granulata*.

A, B, among 20 populations of China using RAPD and ISSR analyses (The population numbers are the same as in Table 1); C, D, among individuals of population M5 using RAPD and ISSR analyses; E, F, among individuals of population M27 using RAPD and ISSR analyses, respectively.

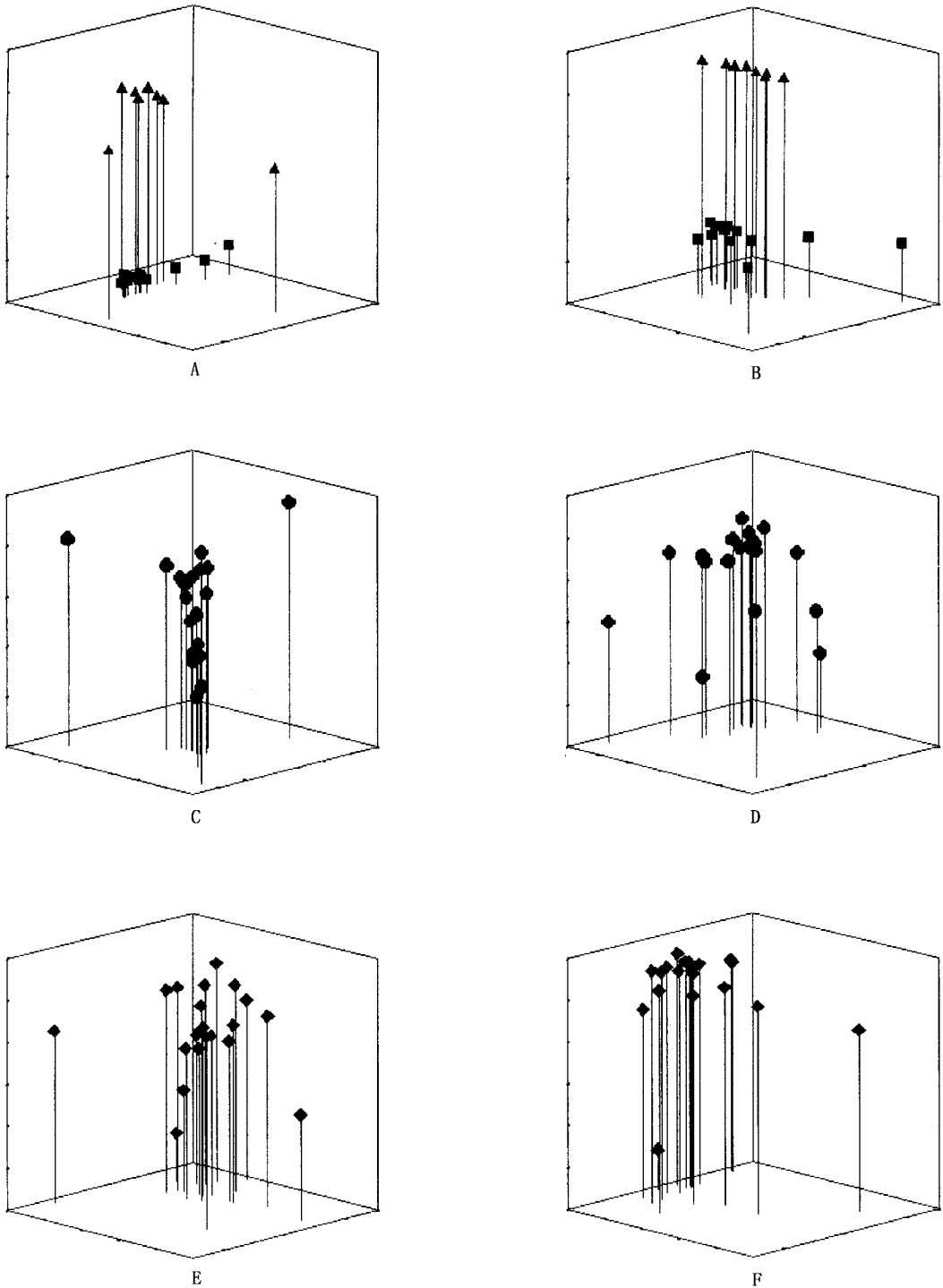


图 4. 中国疣粒野生稻居群内和居群间样品基于 RAPD 和 ISSR 表型的主成分分析 (PCA)。

Fig. 4. Associations among samples of *Oryza granulata* revealed by principal component analyses (PCA).

A, B, among 20 populations from China generated by RAPD and ISSR; C, D, among individuals of population M5; E, F, among individuals of population M27 by the two markers, respectively.

▲, populations of Hainan; ■, populations of Yunnan; ●, individuals of population M5; ◆, individuals of population M27.

内的个体可被区分开 (图 4, C、D、E、F)。此外, 主成分分析还表明不存在变异集中于少数引物中的情况 (数据未显示)。

2.4 RAPD 与 ISSR 之间的相关分析

为了检测同组样品内 RAPD 和 ISSR 分析的相关程度, 利用 Mantel 检测对基于这两种标记的样品

遗传相似性系数矩阵进行了相关分析。由表 5 可见, RAPD 和 ISSR 检测的遗传相似性在中国的疣粒野生稻居群中极显著相关($r = 0.9170$, $t = 12.789 > t_{0.01}$), 在 3 000 次置换(permutation)过程中, 没有一次超过或等于 Z 值。然而, 这两种标记在居群内却完全缺乏相关性: 在 M5 中, RAPD 和 ISSR 的相关性极低($r = 0.1916$, $t = 1.131 < t_{0.01}$)。3 000 次置换(permutation)过程中共有 398 次大于 Z 值。同样, 在居群 M27 中, RAPD 和 ISSR 的相关性仅有 0.1626($t = 1.076 < t_{0.01}$), 置换(permutation)过程中共有 421 次超过 Z 值。

表 5 疣粒野生稻居群内和地区间基于 RAPD 和 ISSR 分析遗传相似性的 Mantel 检测

Table 5 Mantel test between genetic similarity matrices generated by RAPD and ISSR within populations and between regions

Population	$r^{2)}$	t	p	Permutation ³⁾		
				< Z	= Z	> Z
China ¹⁾	0.9170	12.789	1.0000	3 000	0	0
M5	0.1916	1.131	0.8710	2 602	0	398
M27	0.1626	1.076	0.8590	2 579	0	421

1) Consists of 20 samples bulked from 20 populations, respectively; 2) r = normalized Mantel statistic Z ; 3) 3 000 permutations were performed.

3 讨论

3.1 实验稳定性

对于要求检测大量样本的遗传多样性和居群遗传结构研究来说, 检测手段的实验稳定性是至关重要的问题。过去很多研究证明 RAPD 对 PCR 反应的条件比较敏感^[10, 19-21], 本研究的结果证实了这一点。在研究中, RAPD 对 Mg^{2+} 的浓度、PCR 反应的退火温度、模板的纯度(特别是经蛋白酶 K 处理的总 DNA)等反应条件的改变都非常敏感, 主要表现为产物丰度的增减、弱带的不稳定甚至带谱的明显改变。因此, RAPD 在植物居群遗传学和保护遗传学研究中的成功应用要求对绝大多数反应条件进行精确控制, 并确保使用同一批次的 *Taq* 酶和同一台 PCR 热循环仪。在 PCR 反应基本组分稳定的情况下, Clark^[22]认为模板 DNA 的质量和纯度差异是造成 RAPD 不稳定的主要原因, 我们的研究支持这一观点。其中, 对模板进行蛋白酶 K 处理后 RAPD 谱带改变的原因可能是纯化改变了引物与模板结合位点退火时的竞争结合能力, 也有可能是因为纯化过程中引入了某些影响 PCR 反应的离子^[11]。此外, 我们的研究表明如果在野外利用变色硅胶能于 8 h 内对植物材料进行完全干燥, 则叶片样品 DNA 的降解可维持在较低水平, 这也是利用 RAPD 分析获得稳定

结果时必须注意的问题。

ISSR 对 PCR 反应的敏感性低于 RAPD。本研究中的绝大多数 ISSR 引物对经 RNA 酶 A 和蛋白酶 K 处理的模板进行扩增时与对照实验相比并未出现产物带谱的改变。显然这是由于 ISSR 引物长度一般都在 15~24 bp, 反应退火温度较高, 引物-模板复合物比较稳定的结果。在进行正式试验时, 也很少出现由于随机因素造成反应不稳定的情况。Gilbert 等^[4]和 Yang 等^[23]的研究结论同样表明 ISSR 的反应稳定性优于 RAPD, Jonsson 等^[24]的研究也认为在进行克隆植物遗传多样性的研究时可优先考虑使用 ISSR。

3.2 遗传多样性

我们的研究表明, 疣粒野生稻的遗传多样性较低, 分布于中国的疣粒野生稻 RAPD 分析的 *PPB* 值为 64.11% (209 条带中 134 条为多态); 在地区内, 来自云南 12 个居群的样品 RAPD 的 *PPB* 值为 34.57%, 海南 8 个居群样品的 *PPB* 值为 44.51%。同样用 RAPD 分析遗传多态性, Ge 等^[25]的研究表明中国和巴西 8 个居群的普通野生稻 (*Oryza rufipogon*) 的 *PPB* 可达到 82.1% (95 个条带中有 78 条为多态)。高地和低地的栽培稻 (*O. sativa*) 的多态条带比率达到 80% (260 个条带中有 208 条为多态)^[26]。虽然如此, 研究表明 RAPD 和 ISSR 检测疣粒野生稻遗传变异的能力都高于等位酶分析^[16], 而且根据多态条带比率和 Shannon 多样性指数分析(表 3), ISSR 能比 RAPD 检测到更多的遗传多态。显然, 这与它们在对基因组进行扩增时引物结合位置的不同有直接的关系: ISSR 的引物中包含有一定长度的重复序列, 与它结合的目标序列(多为微卫星(microsatellite))在 DNA 复制过程中存在滑动(slippage)和不等交换等现象, 使得它们在不同个体间的重复次数存在较大差异, 更易于导致引物结合位点和两结合位点间的片断长度产生变异^[27]。相同地, Gilbert 等^[4]、Yang 等^[23]和 Jonsson 等^[24]的研究都证明, 比起利用随机引物对基因组进行扩增的 RAPD 来说, ISSR 检测遗传多态性的能力更高。同时我们的研究还表明 5' 端锚定的引物比 3' 锚定的引物(如 ISSR-8 和 ISSR-9)能扩增出更多的条带和获得更高的多态条带比率。由于 RAPD 和 ISSR 的实验过程和费用基本一致, 在可以用琼脂糖电泳获得清晰条带而避免使用聚丙烯酰胺凝胶和放射性自显影(或银染)的前提下, ISSR 标记获得单位引物多态位点比率的能力明显高于 RAPD。

3.3 遗传相似性

在研究中,无论是居群间还是居群内,RAPD 和 ISSR 都能将不同的个体或样品区分开,说明这两种遗传标记技术可以有效地应用于象疣粒野生稻这一类遗传多态性低的物种的个体鉴定和遗传多样性评价研究中。GS 分析表明来自海南的样品和来自云南的样品之间的平均 GS 仅为 0.596 (RAPD) 和 0.511 (ISSR) (数据未显示),远低于居群内和地区内的平均 GS 值(表 4)。由此可见,疣粒野生稻自然居群的遗传变异大部分存在于地区之间,海南和云南两地的疣粒野生稻居群之间产生了相当可观的遗传分化。此外,Shannon 多样性指数分析表明不同的 RAPD 或 ISSR 引物在检测地区间、地区内和居群内遗传变异的分辨力差异很大。例如,RAPD 引物 Z-3 扩增产物中 400 bp 和 800 bp 片断仅在来自云南省的个体中为扩增阳性,海南省个体中则为阴性,并且这一结果表现非常稳定,仅凭该引物即可区分两地的疣粒野生稻。但是,该引物在居群 M5 和 M27 中的多样性指数分别为 0.406 和 0.178,必须联合其他引物的结果才能有效地区分开居群内个体间的遗传差异。这也说明在将两种标记应用于居群内水平时,它们的分辨力相应有所下降,这与疣粒野生稻的遗传结构特点是一致的。

3.4 RAPD 与 ISSR 的一致性

Mantel 检测表明,在居群内,RAPD 和 ISSR 对个体间遗传关系检测结果的相关性极低(表 5),相关系数均不足 0.2。对样品的聚类分析也支持这一结论,即 RAPD 和 ISSR 获得的聚类图的形状差异较大。如前所述,这与两种标记技术对基因组不同特性片断的扩增有关。类似的研究^[28,29]表明 RAPD 和微卫星分析之间也缺乏相关性。然而,在利用 RAPD 和 ISSR 对中国的疣粒野生稻居群进行分析时,这两种标记之间却存在极显著的相关性。这可能是由于疣粒野生稻的遗传变异大部分存在于地区之间,研究中所用的 RAPD 和 ISSR 标记数量已经可以相对无偏地检测到这些遗传变异。但是在居群之内,因为遗传变异的水平较低,在标记数量相同的前提下会导致检测居群内变异时的分辨率下降。例如,ISSR-17 和 ISSR-18 在 20 个混合居群中都获得了比较高的多样性指数,但在检测 M5 和 M27 居群内变异时却没有多态条带出现。在这种情况下,如果增加 RAPD 或 ISSR 标记的数量,则有可能在这两种方法之间获得比较一致的结果。另一方面,这种 RAPD 和 ISSR 在地区间检测结果高度一致而在居群

内检测结果存在较大差异的现象也表明遗传变异在疣粒野生稻居群内、居群间和地区间可能存在不同的进化模式。因此,有必要进一步研究各种进化动力在不同结构层次对疣粒野生稻遗传变异的作用与影响。

3.5 遗传多样性保护

了解物种遗传变异在空间上的分布格局对于制定科学的保护策略起着极为重要的作用。由于中国疣粒野生稻的遗传变异大部分存在于海南和云南两地区之间,在这两个地区分布的该物种已经产生了相当可观的遗传分化。所以,将来进行遗传多样性保护时,首先对海南和云南两省的疣粒野生稻应该给予同等的重视程度,如有可能应分别建立两省的疣粒野生稻种质资源库。此外,根据该物种居群内遗传多样性较低、而居群间遗传多样性较高的特点,在原位保护时应该在其不同的分布点建立尽可能多的保护区或保护点。进行易地保护时则对同一居群内的取样可以相应地减少,而把重点放在对尽可能多的居群进行取样上。关于应该选取多少居群,理论上每个居群应保护多少个体才能达到使中国这一重要的种质资源在干扰下避免遗传侵蚀和杂合度急剧下降的研究正在进行。

致谢: 本实验室谢中稳博士协助参加部分野外工作,中国科学院海洋研究所的赫英俊先生和南京林业大学的黄敏仁教授惠赠 ISSR 引物,特致谢忱。

参考文献:

- [1] Stebbins G L. A brief summary of my idea on evolution. *Amer J Bot*, 1999, **86**: 1207 - 1208.
- [2] Mayr E. Understanding evolution. *Trend Evol Ecol*, 1999, **14**: 372 - 373.
- [3] Hedrick P W. Conservation genetics and molecular techniques: A perspective. Smith T B, Wayne R K. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford: Oxford University Press, 1996. 459 - 477.
- [4] Gilbert J E, Lewis R V, Wilkinson M J, Caligari P D S. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theor Appl Genet*, 1999, **98**: 1125 - 1131.
- [5] Schaal B A, Leverich W J, Rogstad S H. Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. Falk D A, Holsinger K E. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press, 1991. 123 - 134.
- [6] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*,

- 1990, **18**:6531 – 6535.
- [7] Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genome*, 1994, **20**: 178 – 183.
- [8] Wolff K, Richards M M. The use of RAPD data in the analysis of population genetic structure: case studies of *Alkanna* (Boraginaceae) and *Plantago* (Plantaginaceae). Hollingsworth P M, Bateman R M, Gornall R J. *Molecular Systematic and Plant Evolution*. London: Taylor & Francis, 1999. 51 – 73.
- [9] Kantetky R V, Zhang X, Bennetzen J L, Zehr B Z. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol Breed*, 1995, **1**:365 – 372.
- [10] Fritsch P, Rieseberg L H. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. Smith T B, Wayne R K. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. London: Oxford University Press, 1996. 54 – 73.
- [11] Wang X-Q (汪小全), Zou Y-P (邹喻苹), Zhang D-M (张大明), Zhang Z-X (张志宪), Hong D-Y (洪德元). Problems in the use of RAPD to the study of genetic diversity and systematics. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1996, **38**: 954 – 962. (in Chinese)
- [12] Cruzan M B. Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology*, 1998, **79**:400 – 412.
- [13] Aggarwal R K, Brar D S, Khush G S. Two new genomes in the *Oryza* complex identified on the basis of molecular divergence analysis using total genomic DNA hybridization. *Mol Gen Genet*, 1997, **254**:1 – 12.
- [14] Ge S, Sang T, Lu B R, Hong D Y. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**:14400 – 14405.
- [15] Vaughan D A. *The Wild Relatives of Rice*. Manila: IRRI, 1994. 40.
- [16] Gao L Z, Ge S, Hong D Y, Zhang J W, Luo Q Y, Tao G D, Xu Z F. A study on population genetic structure of *Oryza meyeriana* (Zoll. et Mor. ex Steud.) Baill. from Yunnan and its *in situ* conservation significance. *Sci China (Ser C)* 1999, **42**:102 – 108.
- [17] Xie Z-W (谢中稳), Ge S (葛颂), Hong D-Y (洪德元). Preparation of DNA from silica gel dried mini-amount of leaves of *Oryza rufipogon* for RAPD study and total DNA bank construction. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1999, **41**: 807 – 812.
- [18] Rohlf F J. NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, v. 1.80. New York: Exeter Software, 1994.
- [19] Schierwater B, Ender A. Different thermostable DNA polymerase may amplify different RAPD products. *Nucl Acids Res*, 1993, **21**:4647 – 4648.
- [20] Ellsworth D L, Rittenhouse K D, Honeycutt R L. Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques*, 1993, **14**:214 – 217.
- [21] Skroch P, Nienhuis J. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distances. *Theor Appl Genet*, 1995, **91**:1086 – 1091.
- [22] Clark M S. *Plant Molecular Biology—A Laboratory Manual*. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 242.
- [23] Yang W P, Oliveira A C, Godwin I, Schertz K, Bennetzen J L. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Sci*, 1996, **36**:1669 – 1676.
- [24] Jonsson B O, Jonsdottir I S, Cronberg N. Clonal diversity and allozyme variation in population of the arctic *Carex bigelowii* (Cyperaceae). *J Ecol*, 1996, **84**:449 – 459.
- [25] Ge S, Oliveira G C, Schaal B A, Gao L Z, Hong D Y. RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. *Heredity*, 1999, **82**:638 – 644.
- [26] Yu L X, Nguyen N T. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 1994, **87**: 668 – 672.
- [27] Bruford M W, Cheesman D J, Coote T, Green H A, Haines S A, O'Ryan C, Williams T R. Microsatellites and their application to conservation genetics. Smith T B, Wayne R K. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford: Oxford University Press, 1996. 237.
- [28] Russell J R, Fuller J D, Macaulay M, Hatz B G, Jahoor A, Powell W, Waugh R. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**: 714 – 722.
- [29] Pejje I, Marsan P A, Morgante M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G, Motto M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *Theor Appl Genet*, 1998, **97**:1248 – 1255.

(责任编辑:梁燕)